

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

**Untersuchungen an Koagulaseanreicherungen
von *Staphylococcus aureus*
vom Rind und vom Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Uwe Eller
Tierarzt aus Walbeck

Gießen 1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

**Untersuchungen an Koagulaseanreicherungen
von Staphylococcus aureus
vom Rind und vom Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Uwe Eller
Tierarzt aus Walbeck

Gießen 1971



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
in Gießen

Dekan: Professor Dr. G. Lämmner

Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1971



Durchgeführt mit Unterstützung der
Deutschen Forschungsgemeinschaft

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1,0 Einleitung	1
2,0 Literaturübersicht	2
2,1 Biochemische Eigenschaften und Pathogenität	2
2,2 Reinigung von Koagulase	3
2,3 Koagulase Reacting Faktor (CRF)	4
2,4 Clumping Faktor (CF)	5
2,5 Plasmaverhalten	5
2,6 Serologie	6
3,0 Material und Methoden	7
3,1 Kulturen	7
3,2 Medien	7
3,21 Feste Nährmedien	7
3,22 Flüssige Nährmedien	8
3,23 Testmedien	8
3,3 Plasma	9
3,4 Tests und Messungen	10
3,41 Plattentests	10
3,42 Koagulasetest	11
3,43 Hämolyseintest	13
3,44 Test auf Clumping Faktor	13
3,45 Quantitative Eiweißbestimmung	14
3,46 Optische Dichtemessungen	14
3,47 Zellzählungen	14
3,5 Gewinnung von Koagulase	14
3,51 Versuchsbedingungen	14
3,52 Produktion und Anreicherung	15
3,53 Gefriertrocknung und Aufbewahrung	17
3,6 Herstellung von Antiseren	17
3,7 Antikoagulasebestimmungen	19

	Seite
3,8 Elektrophorese	19
3,81 Versuchsanordnung	19
3,82 Immunelektrophorese	20
4,0 Ergebnisse	22
4,1 Kulturen	22
4,11 Identifizierung von <u>S. aureus</u>	22
4,12 Kristallviolettgruppen	22
4,13 Koagulierende Eigenschaften	23
4,14 Clumping-Faktor (CF)-Reaktion	24
4,15 Auswahl und Charakterisierung	25
4,2 Produktion von Koagulase	27
4,21 Kulturbedingungen	27
4,22 Anreicherung von Koagulase	30
4,23 Hämolyisin	32
4,3 Charakterisierung der Koagulasen	32
4,31 Kreuzneutralisationstest	32
4,32 Elektrophorese	34
4,33 Immunelektrophorese	36
5,0 Diskussion	40
6,0 Zusammenfassung	43
7,0 Literaturverzeichnis	47
Lebenslauf	

1,0 EINLEITUNG

Die Koagulase von Staphylococcus aureus, Staphylokoagulase, gilt als ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal. Die Koagulasebildung stellt zusammen mit der Mannit-Spaltung die Kriterien zur Differenzierung von S. aureus und S. epidermidis dar.

Der Wirkungsmechanismus von Staphylokoagulase ist bis heute noch nicht völlig geklärt, obschon mit der Entdeckung eines im Plasma vorhandenen Faktors, dem Koagulase Reacting Faktor (CRF), ein wesentlicher Einblick gelungen war. Der CRF ist zum Wirksamwerden des Enzyms unabdingbar (48). Außerdem machte MEYER (29) eine bemerkenswerte Beobachtung: Er fand, daß S. aureus-Stämme vom Menschen regelmäßig Menschenplasma und selten Rinderplasma koagulierten, während solche Stämme vom Rind regelmäßig Menschenplasma und in der Mehrzahl der Fälle auch Rinderplasma koagulierten. Diese Beobachtungen wurden auch in unserem Institut von DURRANI (7) bestätigt und führten zu diesen weiteren Untersuchungen an Koagulasen von S. aureus vom Menschen und vom Rind.

2,0 LITERATURÜBERSICHT

2,1 Biochemische Eigenschaften und Pathogenität

LOEB (24) erkannte im Jahre 1903, daß "bestimmte" Bakterien die Fähigkeit besitzen, Plasma zur Gerinnung zu bringen. MUNCH (32) identifizierte die koagulierenden Bakterien als S. aureus und hielt das koagulierende Agens für eine Vorstufe des "Fibrinferments". Mehrere Autoren beschäftigten sich in der folgenden Zeit mit der Frage, ob sich die Koagulation des Plasmas auch in vivo nachweisen ließ. Einen wesentlichen Erfolg in dieser Hinsicht errangen HALE und SMITH (16) und SMITH, HALE und SMITH (43). Sie bewiesen, daß durch Staphylokoagulase geronnenes Plasma die Phagozytose der Staphylokokken durch Leukozyten hemmte. Sie sahen das Wesen der Pathogenität von Koagulase in der Plasmagerinnung, die eine Ansiedlung von Staphylokokken im Wundgewebe erst ermöglichen sollte. LACK und WAILLING (21) stellten sich gegen die Auffassung, in der Koagulasebildung einen Maßstab für die Virulenz der Staphylokokken zu sehen. Aus ihren klinischen Erfahrungen sowie auf Grund ihrer Versuchsergebnisse soll die Wirkung der Koagulase in vivo unterbunden werden. Sie behaupten, im Organismus werde stets genügend Plasminogen und eine Staphylokinase zur Verfügung gestellt, so daß sofortige Fibrinolyse auftritt. HALE und SMITH (16) und ROGERS und TOMPSETT (37) erkannten, daß sich die Auswirkungen der Koagulase an anderer Stelle bemerkbar machte: Bei der Phagozytose im Retikulo-Endothelialen System (RES). HALE et al. stellten Unterschiede beim Vorgang der Phagozytose fest, wobei Koagulasebildner verzögert phagozytiert wurden. ROGERS et al. fanden jedoch eine nahezu gleichmäßige Phagozytose von koagulase-positiven wie koagulase-negativen Staphylokokken, jedoch blieb eine Vermehrung von koagulase-negativen im Granulozyten aus. SMITH und DUBOS (14)

bestätigten die letztgenannten Untersuchungen und konnten mit koagulase-positiven Staphylokokken renale Abszesse bei Versuchstieren erzeugen, während koagulase-negative Kontrollen im RES unvermehrt blieben, ohne pyogen zu wirken.

Untersuchungen an hochgereinigten Koagulasepräparationen nach der Methode von DUTHIE und HAUGHTON (12) sowie ZOLLI und SAN CLEMENTE (56) führten SIWECKA und JELJASZEWICZ (39) durch, um vergleichend deren Eigenschaften zu prüfen. Nach ihren Untersuchungen besaß hochgereinigte Koagulase einen isoelektrischen Punkt bei pH 5,85. Die Aktivitätsverluste der Präparate waren selbst bei Lagerung im Vakuum und bei niedrigen Temperaturen sehr hoch. TIRUNARAYAN (53) stellte mittels Gelfiltration durch Sepahdex G-100 ein Molekulargewicht von ca. 90 000 fest. Andere Autoren (33, 12) geben Molekulargewichte von 5 000 und 10 000 oder 44 000 an. Sicherlich sind für die Unterschiede die unterschiedlichen Anreicherungsverfahren verantwortlich. TIRUNARAYAN verzichtete auf Verfahren, die eine Denaturierung begünstigt hätten.

Über den biochemischen Charakter von Koagulase bestehen noch viele Unklarheiten. Die Biosynthese scheint durch Glukose und Albumin (10), durch Serum (6), durch Pepton (33) und durch Natrium- β -Glycerophosphat (12, 38) sowie Glutamat (28) stimuliert zu werden.

2,2 Reinigung von Koagulase

Die Reinigung von Koagulase war Voraussetzung zu vielen Untersuchungen an diesem Toxin. WALSTON (55) wendete Äthanol, Essigsäure und Ammoniumsulfat an, um aus zellfreiem Kulturfiltrat Koagulase zu gewinnen. WALKER, DEROW und SCHAFFER (54) gelang eine teilweise Reinigung durch

wiederholte Fällung bei pH 4. Von TAGER (51) wurde eine starke Konzentration von Koagulase durch eine Präzipitation bei pH 3,8 - 4,0 und mehrere anschließende Fällungen in Alkohol erreicht. Eine zusätzliche teilweise Reinigung des Konzentrats erzielte er durch Fraktionierung in Ammoniumsulfat. Durch Fraktionierung in Cadmiumsulfat erhielten DUTHIE und LORENZ (9) ebenfalls teilgereinigte Präparate. Hochgereinigte Koagulasepräparationen stellten DUTHIE und HAUGHTON (12) und BLOBEL, BERMAN und SIMON (3) zur Verfügung. DUTHIE schloß an eine Cadmiumsulfatadsorption eine fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation an, während BLOBEL et al. die Methode von TAGER (51) modifizierten und eine elektrophoretische sowie chromatographische Reinigung anschlossen. Obwohl eine weitgehende Reinigung erzielt werden konnte, waren die Reinigungsprodukte der zuletzt erwähnten Autoren elektrophoretisch sowie immunologisch nicht völlig homogen. Neuere Methoden zur Reinigung erarbeiteten ZOLLI und SAN CLEMENTE (56) und STUTZENBERGER und SAN CLEMENTE (47). Sie unternahmen Säurefällungen bei pH 3,5 und 3,8, adsorbierten das Protein an DEAE-Cellulose und reinigten das Anreicherungsprodukt durch Gel-filtration mit Sephadex G-200. Die Methoden von DUTHIE und HAUGHTON (12) sowie ZOLLI und SAN CLEMENTE (56) führten zu hochgereinigten wie auch elektrophoretisch weitgehend homogenen Präparaten, wie SIWECKA und JELJASZEWICZ (39) bestätigen konnten.

2,3 Koagulase Reacting Faktor (CRF)

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse postulierte TAGER (48) und SMITH und HALE (42) einen Aktivator. TAGER nannte den Aktivator "Coagulase Reacting Factor" (CRF). Er konnte ihn im menschlichen Plasma nachweisen und reinigen (52). Untersuchungen mit gereinigtem Material

(19) zeigten, daß die biochemischen Eigenschaften des CRF denen des Prothrombin sehr ähnlich waren. LIEB (22) beschäftigte sich ebenfalls mit dem Mechanismus der Koagulasereaktion und kam zu dem Ergebnis, daß Koagulase Profermentnatur besitze und zu seiner Aktivierung eine Kinase (Staphylokinase) benötige, die sie zum Vollferment mache. SOULIER und PROU (44) stellten vergleichende Untersuchungen von CRF und Faktor II der Blutgerinnung an.

2,4 Clumping Faktor (CF)

Eine weitere fundamentale Entdeckung machten DUTHIE und HAUGHTON (12). Sie grenzten von der eigentlichen Staphylokoagulase, auch "freie Koagulase" genannt, die "gebundene" ab. Sie fanden die Staphylokoagulase stets im Medium als Stoffwechselprodukt der Staphylokokken vor, während die "gebundene Koagulase" Bestandteil der Bakterienzellwand war und erst nach der Autolyse frei wurde. Die "gebundene Koagulase" wurde als Clumping Faktor (CF) bezeichnet und vor allem von LIPINSKI (23) eingehend untersucht.

2,5 Plasmaverhalten

Eng verbunden mit dem Problem des Aktivators (CRF) ist die Frage nach den Gründen für Unterschiede im Verhalten gegenüber Plasma verschiedener Spezies. Diesbezügliche Untersuchungen stellten SMITH und HALE (42), SMITH (40), STAMATIN, TACU und MARCIA (45) und STAMATIN et al. (46) an. Auch EDWARDS und RIPPON (13), NAKAGAWA (34), KEITH et al. (20) sowie ILLÈS (18) fanden stets Unterschiede im Plasmaverhalten. MEYER (29) prüfte daraufhin S. aureus-Stämme sowohl vom Menschen als auch vom Rind auf deren Plasmaverhalten. Von 600 Stämmen vom Rind koagulierten 449 sowohl Rinderplasma wie auch Menschenplasma, 151 nur

Menschenplasma. Von 1817 Stämmen vom Menschen koagulierten alle Menschenplasma und 3 Rinderplasma. Er machte aufgrund dieser Ergebnisse den Vorschlag, in die Differenzierung der S. aureus-Stämme ihr Plasmaverhalten mit einzubeziehen.

2,6 Serologie

LOMINSKI und ROBERTS (25) untersuchten über 300 Seren vom Menschen und fanden dabei, daß in rund 2/3 aller untersuchten Proben ein spezifischer Faktor enthalten war, der die Koagulation verhinderte. Der Faktor wirkte neutralisierend auf Koagulase, und LOMINSKI vermutete einen Antikörper. Derselbe Autor (26) stellte fest, daß hohe Dosen von Antikoagulase Reinfektion mit S. aureus verhinderten. Auch TAGER und HALES (49) sowie DUTHIE und LORENZ (9) fanden schließlich spezifische Antikörper gegen Staphylokoagulase bei Kaninchen, RAMMELKAMP (36) auch bei Affen und Geflügel. Mit Koagulase vakzinisierte Tiere wurden vor Reinfektion geschützt (4). Auch andere serologische Untersuchungen mit Koagulaseanreicherungen und gereinigten Präparaten erwiesen den antigenen Charakter von Koagulase: TAGER und HALES (50), RAMMELKAMP, HEZEBICKS und DINGLE (35), DUTHIE (8). DUTHIE beschrieb 4 serologische Typen. BARBER und WILDY (2) fanden spezifische Antikoagulasen gegen Staphylokokken der Lysogruppen I, II, III und der "Lyso-typen" 3A und 42E. Auch zeigten elektrophoretische Untersuchungen, daß unterschiedliche Koagulasen auftraten. MIALE, WINNINGHAM und KENT (31) demonstrierten nach einer Stärkegelelektrophorese bis zu fünf Isoagulasen und vertraten daraufhin die Ansicht, daß Staphylokokken eine "ganze Familie" von Koagulasen ins Medium abgeben können. HENDERSON und BRODIE (17) erzeugten mit Koagulaseaufbereitungen Antikörper und kamen zu der Überzeugung, daß ein und derselbe S. aureus-Stamm mehrere Koagulasen produzieren könnte.

3,0 MATERIAL UND METHODEN

3,1 Kulturen

Zur Untersuchung wurden S. aureus-Kulturen herangezogen, die teils aus menschlichen Abszessen, teils aus der Milch euterkranker Kühe isoliert worden waren.

Die Kulturen wurden bei 4°C auf Schrägagar gehalten. Ihre Überimpfung erfolgte alle 6 Wochen. Zur Auffrischung wurde nach jeweils 3 Monaten eine Passage über Schafblutagarplatten vorgenommen.

3,2 Medien

3,21 Feste Nährmedien

Schafblutagar

Zur Kultivierung der Staphylokokken wurden Schafblutagarplatten verwendet. Das zur Herstellung der Platten verwendete Medium bestand aus:

- 0,1 % Pepton¹⁾
- 0,5 % Fleischextrakt nach Liebig²⁾
- 0,2 % Natriumdiphosphat
- 0,3 % Natriumchlorid
- 2,0 % Agar agar³⁾

Das Medium wurde vor dem Ausgießen autoklaviert, auf 52°C abgekühlt und mit defibrinisiertem Schafblut im Verhältnis 9 : 1 vermischt.

1) E. Merck AG, Darmstadt

2) Companie Liebig, Antwerpen

3) Bayer, Leverkusen

Schrägagar

Zum Aufbewahren der Kulturen eignete sich in Reagenzgläsern ausgegossener Schrägagar. Er wurde aus Bacto Blood Agar Base¹⁾ hergestellt, dem 0,5% Agar¹⁾ zugesetzt wurden.

3,22 Flüssige Nährmedien

Als flüssiges Kulturmedium wurde Brucella Broth²⁾ gewählt.

3,23 Testmedien

Zur Charakterisierung der Staphylokokkenkulturen wurden in erster Linie Plattentests herangezogen.

Die Mannitspaltung wurde auf Platten nach Anweisung von ELEK (14) unter anaeroben Bedingungen geprüft.

Nuklease wurde mit "DNase Testmedium"³⁾ nachgewiesen.

Fibrinolysinaktivität wurde auf Plattenmedien nach DURRANI (7) beobachtet.

Das Phosphatasetestmedium bestand aus:

0,2 % Bacto-Pepton¹⁾

0,05% Hefeextrakt⁴⁾

2,0 % Agar.

1) Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

2) Albimi Laboratories, New York, USA

3) Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland, USA

4) Merck AG, Darmstadt

Dem Testmedium wurde 0,1% p-Nitrophenylphosphat als Indikator zugesetzt.

Zum Nachweis der Proteaseaktivität wurde ein 2%iges Agarmedium mit 0,5% Gelatinezusatz¹⁾ verwendet.

Die Lipasebildung wurde auf einem Medium beobachtet, welches 2% Agar und 10% "Egg-yolk-emulsion"²⁾ enthielt.

Die Platten zur Beurteilung des Verhaltens gegenüber Kristallviolett wurden nach Angaben von MEYER (30) hergestellt.

3,3 Plasma

Zur Prüfung auf Koagulasebildung wurde Plasma vom Rind, Kaninchen und Menschen benutzt.

Rinderblut wurde von 5 Jungrindern bei der Schlachtung steril aufgefangen.

Kaninchenblut wurde von jungen Kaninchen durch Herzpunktion gewonnen.

Zur Herstellung von Menschenplasma standen abgelaufene Blutkonserven von der Blutbank der Universitätskliniken Gießen zur Verfügung.

Um die Blutgerinnung zu verhindern, wurden dem Rinder- und Kaninchenblut zehn Volumenteile einer 3,8%igen sterilen Natriumcitratlösung zugesetzt.

Das Plasma der drei Spezies wurde durch Abzentrifugieren der Blutzellen bei 800xg gewonnen, jede Plasmaart in einem

1) Merck AG, Darmstadt

2) Oxoid Ld., London

Pool vereint und in Einzelproben von 10 - 15 ml bei 20°C aufbewahrt.

3,4 Tests und Messungen

3,41 Plattentests

Da die Mannitspaltung neben der Koagulaseproduktion als wesentliches Kriterium bei der Zuordnung zu S. aureus gilt, wurden alle Kulturen auf ihre d-Mannit-Dehydrogenaseaktivität untersucht. Die Kulturen wurden in Form von Tüpfeln auf die Platten aufgetragen und unter anaeroben Bedingungen 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Bei positiver Reaktion schlug der Indikator nach gelb um, was sich durch einen gelben Hof um die positive Kolonie bemerkbar machte.

Ferner war von Interesse, wie weit sich die Staphylokokken Kristallviolettgruppen (30) zuteilen ließen. Die Stämme wurden zu dieser Untersuchung in Tüpfelform auf Kristallviolettagar aufgetragen, 24 Stunden bei 37°C bebrütet und dann nach dem von MEYER erarbeiteten Schlüssel beurteilt.

Zur Beurteilung der übrigen auf Platten getesteten Enzyme wurde von zellfreiem Kulturüberstand oder in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem lyophilisiertem Material ausgegangen. Von der Testflüssigkeit wurden je 100 Mikroliter in Metallzylinder verbracht, die senkrecht auf den Testagar aufgeschmolzen worden waren. Auf diese Weise wurden die Aktivitäten der Nuklease, des Fibrinolysins, der Phosphatase, der Protease, der Lipase und des Eigelbfaktors getestet.

Mit Ausnahme der Phosphatasetestplatten wurden die übrigen Testmedien 24 Stunden bei 37°C gehalten, während Phosphatasetestplatten nur 6 Stunden bebrütet wurden.

Die Beurteilung der Phosphatasebildung, des Fibrinolysins und des Eigelbfaktors erfolgte unmittelbar nach der Bebrütung. Die positive Phosphatasereaktion zeichnete sich durch gelbgrüne Hofbildung aus, die positive Fibrinolysinreaktion durch die Bildung eines durchsichtigen Hofes um den Zylinder, während bei positivem Ausfall des Tests auf Eigelbfaktor zwischen Lyse, Trübung und Irisierung unterschieden wurde.

Zum Nachweis von Nuklease- und Proteasebildung wurden die Zylinder von den Testplatten entfernt. Die Nukleasetestplatten wurden zur Auswertung mit einer 1 n HCl-Lösung übergossen. Positive Reaktionen machten sich in beiden Fällen durch getrübbte Hofbildung erkennbar.

3,42 Koagulasetest

Der Test auf Koagulasebildung wurde nach MEYER (29) modifiziert.

Zum Test wurden sterile Agglutinationsröhrchen von 8 ml Inhalt verwendet. Verdünnungsmedium war sterile physiologische Kochsalzlösung.

Rinder- und Menschenplasma wurde unverdünnt, Kaninchenplasma 1 : 5 verdünnt verwendet.

Bei der Durchführung des Tests wurde entweder von zellfreiem Kulturüberstand oder in physiologischer Kochsalzlösung gelöster, angereicherter Substanz ausgegangen. Es wurde eine zweifache Verdünnungsreihe von 1 : 1 bis 1 : 2048 angelegt; jede Verdünnungsstufe enthielt 0,5 ml zu testender Flüssigkeit und wurde zur Untersuchung auf Koagulasegehalt mit der gleichen Menge Plasma vermischt.

Die Bebrütungsdauer betrug 3 Std. bei 37°C, dann erfolgte die erste Ablesung. Die Proben blieben danach weitere 18 Std. bei Zimmertemperatur stehen, ehe die zweite Ablesung vorgenommen wurde.

Zwecks übersichtlicher Auswertung des Tests wurde ein Schlüssel verwendet (Tab. 1).

Tabelle 1
Schlüssel zur Auswertung der Ergebnisse
des Koagulasetestes

Bezeichnung der Reaktion	Erscheinungsbild	MCD ¹⁾
-	keine sichtbare Koagulation	0
<u>+</u>	soeben erkennbare Koagulation	0,25
1 +	Koagulum nimmt 1/4 der Testflüssigkeit ein	0,5
2 +	Koagulum nimmt 1/2 der Testflüssigkeit ein	1
3 +	Koagulum nimmt 3/4 der Testflüssigkeit ein	1,5
4 +	Koagulum ist fest und trocken	2

1) MCD - Minimale Clotting Dosis

Mit Hilfe dieses Schlüssels wurde auch die Minimale Clotting Dosis (MCD) definiert: 1 MCD war in der höchsten Verdünnungsstufe vorhanden, in welcher nach 3 Std. bei 37°C mit 1 : 5 verdünntem Kaninchenplasma eine 2 + Reaktion vorhanden war.

3,43 Hämolysintest

Kulturüberstände und Anreicherungsprodukte wurden auf ihren Hämolysingehalt mit der Methode von GLADSTONE (15) geprüft. Getestet wurde in Agglutinationsröhrchen von 8 ml Inhalt; die zu testenden Flüssigkeitsmengen betrugen jeweils 0,5 ml. Loyphilierte Koagulase-Anreicherungen wurden in 0.14 M NaCl gelöst.

Der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe, bei welcher noch soeben vollständige Hämolyse vorlag, wurde als "Minimale Hämolytische Dosis" (MHD) angegeben. α - und Δ -Hämolysinaktivitäten wurden nach 1 Std. bei 37°C, β -Hämolysinaktivitäten wurden nach 1 Std. bei 37°C und einer weiteren Stunde bei 4°C abgelesen.

3,44 Test auf Clumping Faktor (CF)

Das Vorhandensein des CF wurde mit 2 Methoden geprüft. Die 1. Methode wurde von ALAMI (1) übernommen. Hierbei wurden lebende Staphylokokken in einem Softagar-medium suspendiert. Nach 3 Std. bei 37°C wurden die Proben weitere 15 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Kompaktes Wachstum zeigte das Vorhandensein des CF an.

Eine später angewendete Methode erwies sich als wesentlich empfindlicher. Sie war im wesentlichen 1955 von DUTHIE (11) beschrieben worden. Es wurden tannierte Erythrozyten vom Schaf mit Rinderfibrinogen¹⁾ beladen und auf einem Objektträger mit in 0.14 M NaCl aufgeschwemmten Staphylokokken vermischt. Nach maximal 30 Sek. zeigte sich bei positiver Reaktion eine Verklumpung von Bakterienzellen und Erythrozyten.

1) The British Drug Homes Ltd., Poole, England

3,45 Quantitative Eiweißbestimmung

Quantitative Proteinbestimmungen wurden mit der Folin Phenol Reagens-Methode (27) durchgeführt und bei 750 nm¹⁾ ausgewertet. Verwendet wurden Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 20 mm.

3,46 Optische Dichtemessungen

Bei der Untersuchung der Wachstumsbedingungen wurde die Abnahme der Lichtabsorption im Kulturmedium gemessen. Die optischen Dichtemessungen wurden bei 600 nm²⁾ ausgewertet. Es wurden hierfür Spezialröhrchen²⁾ von 20 mm Schichtdicke verwendet.

3,47 Zellzählungen

Zellzählungen wurden in einer Zählkammer nach Thoma vorgenommen. Es wurden je Zählung 16 Gruppenquadrate ausgezählt und der Mittelwert zur Berechnung herangezogen. Die Auszählung fand bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop statt.

3,5 Gewinnung von Koagulase

3,51 Versuchsbedingungen

Der Produktion von Koagulase gingen Untersuchungen der Wachstumsbedingungen voraus. Dabei sollten die Enzymaktivitäten von Koagulase und Hämolyysin mit den Werten

1) Photometer PM Q2, Carl Zeiss, Oberkochen

2) Photometer Spectronic 20, Bausch und Lomb GmbH, Frankfurt/Main

einer Wachstumskurve verglichen werden, um Anhaltspunkte für die günstigste Bebrütungszeit der Hauptkultur zu bekommen.

Brucella Broth¹⁾ wurde als Kulturmedium sowohl für Vor- wie auch Hauptkultur verwendet. Die Vorkulturen wurden in 200-ml-Kolben mit je 20 ml Bouillon Inhalt, die Hauptkulturen in 2-l-Kolben mit je 200 ml Bouillon, angesetzt.

Die Vorkulturen wurden mit je einer halben Öse frisch überimpften Kulturmaterials beimpft. Den Hauptkulturen wurde bei der Inokulation 1% Vorkultur zugesetzt.

Die Bebrütungszeit betrug bei den Vorkulturen 8 Std., bei den Hauptkulturen 48 Std. Bebrütet wurde bei 37°C auf einer Rundschüttelmaschine²⁾ bei 60 U/Min.

Aus den Hauptkulturen wurden 15 Einzelproben zu je 4 ml steril entnommen (Tab. 7, 8). Die Proben wurden auf Zellgehalt sowie Koagulase- und Hämolyysinaktivität untersucht. Ebenso wurde der pH und die optische Dichte der Bouillon gemessen.

3,52 Produktion und Anreicherung

Nach Beurteilung der Vorversuche wurden für die Produktion von koagulasehaltigem Kulturüberstand folgende Bedingungen gewählt:

Die Vor- und Hauptkulturen wurden bezüglich des Materials und der Mengenverhältnisse unverändert übernommen. Die Bebrütungszeit blieb bei der Vorkultur mit

1) Albimi Laboratories, New York, USA

2) Modell RC4, A. Kühner, Basel

8 Std. gleich, für die Hauptkultur wurde sie auf 4 Std. festgesetzt.

Nach beendigter Bebrütung wurden die Hauptkulturen 20 Min. bei 16600xg und 4°C durch Zentrifugieren¹⁾ von den Zellen befreit. Der so gewonnene Kulturüberstand wurde zur Anreicherung verwendet. Es wurden Proben zu Aktivitätsmessungen von Koagulase und Hämolysin sowie zur quantitativen Proteinbestimmung entnommen.

Bei der Anreicherung wurde je Kultur von 4 Liter Kulturüberstand ausgegangen. Die Anreicherungsschritte bestanden aus einer Säurepräzipitation und einer Ammoniumsulfatpräzipitation (47).

Säurepräzipitation: In den Kulturüberstand wurde bei einer Temperatur von 4°C eine 10 n HCl unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes eingerührt, bis pH 3,6 erreicht war (47). Die Präzipitation wurde in Glasgefäßen durchgeführt, um den Verlust an Präzipitat möglichst gering zu halten, der durch Adhäsion an den Gefäßwänden auftrat. Die Präzipitationszeit betrug 5 Std. Während dieser Zeit verblieb der präzipitierte Überstand in der Kälte.

Bei der Gewinnung des Präzipitates wurde eine Kühlzentrifuge²⁾ verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug bei 26700xg 30 ml/Min.

Das Präzipitat wurde gesammelt und 2 Std. bei 4°C in 20 ml eines 0,01 m Phosphatpuffers eingerührt. Der Puffer war auf den pH-Wert von 7,0 eingestellt. Danach wurde der nicht lösliche Anteil bei 26700xg¹⁾ abzentrifugiert und verworfen.

1) Kühlzentrifuge "Superspeed", Modell RC2B, Iwan Sorvall, Inc. Norwalk, USA

2) Kühlzentrifuge "Superspeed", Modell RC2B mit Continous-Flow-Aufsatz, Iwan Sorvall, Inc. Norwalk, USA

Es wurden Proben entnommen, die 3 Std. gegen physiologische NaCl dialysiert wurden. Mit ihnen erfolgten Aktivitätsmessungen von Koagulase und Hämolyisin sowie eine quantitative Proteinbestimmung.

Ammoniumsulfatpräzipitation: Mit dem Anreicherungsprodukt der Säurepräzipitation wurde eine zweite Fällung mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung vorgenommen. Das Präzipitat verblieb danach 48 Std. in der Kälte. Daraufhin wurde es durch Zentrifugieren bei 26700xg abzentrifugiert, mit einigen ml physiologischer NaCl aufgeschwemmt und einer Dialyse gegen physiologischer NaCl unterzogen. Die Dialyse fand bei 4°C statt und dauerte 4 Std.

3,53 Gefriertrocknung und Aufbewahrung

Nach dem Dialysevorgang wurde das Anreicherungsprodukt lyophilisiert. Nach einer Wägung des Gesamtgewichts wurde eine quantitative Proteinbestimmung durchgeführt. Es schlossen sich Aktivitätsmessungen von Koagulase und Hämolyisin an, um den Anreicherungsfaktor bestimmen zu können.

Das lyophilisierte Material wurde in Schraubröhrchen bei 4°C aufbewahrt, welche in ein Vakuum verbracht wurden.

3,6 Herstellung von Antiseren

Zur Erzeugung von Antiseren wurden 8 Kaninchen von ca. 2,5 kg Körpergewicht verwendet, deren Serum vor den Injektionen nicht mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen reagierte. Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet: Die erste Gruppe erhielt Koagulasepräparationen, die von Staphylokokkenkulturen vom Rind (R 3, R 9) hergestellt worden waren, die zweite solche von Staphylokokken

vom Menschen (M 3, M 6). Mit jeder Koagulase-Präparation wurden 2 Tiere geimpft.

Als Inokulum diente das lyophilisierte Protein (etwa 500 MCD/mg) aus der Koagulaseanreicherung. Jedem Kaninchen wurden insgesamt 70 mg Protein (etwa 35 000 MCD) eingeimpft und zwar am 1. Tage 5mg, am 8. Tage 10mg, am 15. Tage 20mg, am 22. Tage 25mg, am 29. und 36. Tage je 5mg (Tab. 2). Die berechneten Mengen wurden in jeweils 0,5 ml steriler NaCl-Lösung aufgelöst und unmittelbar vor der Immunisierung mit 0,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvans¹⁾ gemischt. Die Applikation erfolgte intramuskulär an mehreren Körperstellen.

Tabelle 2

Verabreichung von Koagulaseanreicherungen zur Herstellung von Antikörpern in Kaninchen

	Tage						Gesamtmenge
	1.	8.	15.	22.	29.	36.	
mg Protein	5	10	20	25	5	5	70

Da durch die letzte Boosterung kein weiterer Anstieg der Antikoagulasetiter erzielt werden konnte, wurden die Tiere 10 Tage nach der letzten Antigengabe durch Herzpunktion entblutet. Die gewonnenen Antiseren verblieben bis zu ihrer Verwendung, in kleine Portionen aufgeteilt, bei -20°C.

1) Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

3,7 Antikoagulasebestimmungen

Die Methode zur Prüfung der Antiseren auf Antikörpergehalt wurde nach LOMINSKI und ROBERTS (25) modifiziert.

Der Test wurde in sterilen Agglutinationsröhrchen von 8 ml Inhalt ausgeführt. Es wurde eine zweifache Verdünnungsreihe der Antiseren in 0.14 n NaCl-Lösung vorgenommen. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 0,25 ml mit 0,25 ml Antigen-Lösung vermischt. Die Antigen-Lösungen waren so eingestellt, daß 0,25 ml 1 MCD an Koagulase enthielt. Unmittelbar nach der Zugabe der Antigen-Lösung wurden die Proben für 90 Min. bei 37°C bebrütet. Danach wurde mit den Proben der Koagulasetest mit 1 : 5 verdünntem Kaninchenplasma durchgeführt.

Nach dreistündiger Bebrütung bei 37°C wurde abgelesen. Als Titer wurde der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe angegeben, bei dem noch kein Koagulum zu erkennen war.

3,8 Elektrophorese

3,81 Versuchsanordnung

Für die Wanderung im elektrischen Feld wurde eine gepufferte, 1%ige Agarlösung hergestellt,

Zur Bereitung des Puffers wurde ein Veronalpuffersalz¹⁾ verwendet, welches nach Vorschrift des Herstellers gelöst wurde. Die gebrauchsfertige Pufferlösung hatte bei pH 8,6 eine Ionenstärke von 0,1.

1) LKB 3276-VB 10 Puffersalz, LKB-Produkter AB, Stockholm, Schweden

Bei der Bereitung des Trägermediums wurde 1 Teil "Special Agar-Noble"¹⁾ mit 25 Teilen gebrauchsfertiger Pufferlösung und 75 Teilen destilliertem Wasser vermischt und anschließend bis zum völligen Auflösen des Agar in ein siedendes Wasserbad verbracht. Die gepufferte Agarlösung verblieb bis zum Abkühlen in einem zweiten Wasserbad, bis 52°C erreicht waren.

Der Agar wurde auf geschliffenen, entfetteten Objektträgern ausgegossen²⁾. Nach dessen Erstarren wurden die Schienen eine Stunde auf einer Temperatur von 4°C gehalten, ehe sie zur Elektrophorese vorbereitet wurden.

Es wurden bei jedem Elektrophoreseversuch 2 Proben des gleichen Antigens aufgetragen. Die eine Probe diente dem Nachweis der Koagulasewanderung, gegen die zweite diffundierte nach Abschluß der Elektrophorese ein Antiserum.

Es wurden auf diese Weise 18 Antigene einmal auf die Wanderungsfähigkeit des Koagulaseanteils, zum anderen auf ihr Präzipitationsvermögen gegenüber vier verschiedenen Antiseren getestet.

3,82 Immunelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 250 Volt und 4°C. Für konstante Stromstärke sorgte ein regelbares Stromversorgungsgerät³⁾. Koagulase wurde direkt im Elektrophorogramm nachgewiesen. Hierfür diente ein mit Test-

1) Difco-Laboratories, Detroit, USA

2) LKB 6800 A'Immunelektrophoreseausrüstung

3) Spinco Modell RD - 2, Duostat, Beckman Instruments, Inc. Stanford Industrial Park, Palo Alto, California, USA

flüssigkeit getränkter Fließpapierstreifen. Die Testflüssigkeit bestand aus 4% Rinderfibrinogen¹⁾, 20% Kaninchenplasma und 76% physiologischer NaCl-Lösung. Die Koagulasereaktion war in der Regel nach 5 Std. eingetreten. Sie war durch eine milchige Trübung des Mediums deutlich sichtbar.

Zur Immunpräzipitation wurde nach der Elektrophorese ein parallel zur Wanderungsrichtung verlaufender Graben mit Antiserum gefüllt. Nach einer Immundiffusion von etwa 24 Std. traten bei positiver Reaktion Präzipitationslinien auf. Die Immunpräzipitate wurden bei indirekter Beleuchtung auf Reprofilm²⁾ fotografiert. Die Belichtung betrug 1 Sek. bei Blende 8³⁾.

1) Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

2) AGFA AGEPE, 15 Din., Agfa-Gevaert, München

3) Pentax-Spotmatic, Super-Takumar 1 : 1,4/50,
Asahi Opt. Co., Tokio, Japan

4,0 ERGEBNISSE

4,1 Kulturen

4,11 Identifizierung von Staphylococcus aureus

Von insgesamt 188 Staphylokokkenkulturen waren 116 vom Rind, 72 vom Menschen isoliert worden. Alle Kulturen wurden zu Anfang geprüft, ob sie die Fähigkeit der Koagulasebildung und der Mannitspaltung besaßen, Kriterien, die eine Zuordnung zur Spezies Staphylococcus aureus (5) voraussetzen. So konnten als S. aureus 107 Kulturen vom Rind und 34 Kulturen vom Menschen identifiziert werden.

4,12 Kristallviolettgruppen

Die S. aureus-Kulturen wurden daraufhin geprüft, ob die Einordnung in Kristallviolettgruppen mit ihrer Herkunft übereinstimmte:

Von 107 S. aureus-Kulturen, die vom Rind isoliert worden waren, zeigten 99 die Kriterien des Typ A (Rind), 8 die des Typ C (Mensch). Alle S. aureus-Kulturen, die vom Menschen stammten, ließen sich dem Typ C zuordnen (Tab. 3).

Tabelle 3

Reaktion der Staphylococcus-aureus-Kulturen nach 24 Std.
bei 37°C auf Kristallviolettplatten

Herkunft der Kulturen	Gesamtzahl	Kristallviolettgruppe	
		A	C
vom Rind	107	99	8
vom Menschen	34	0	34

4,13 Koagulierende Eigenschaften

Es folgte eine vergleichende Untersuchung der koagulierenden Eigenschaften aller S. aureus-Kulturen gegenüber Plasma vom Rind, vom Menschen und vom Kaninchen. Es wurde zwischen einer Frühreaktion (3 Std.) und einer Spätreaktion (24 Std.) unterschieden:

Von den 107 Kulturen vom Rind koagulierten nach 24 Std. 87 (82%) Rinderplasma, 107 (100%) Menschenplasma und 105 (98%) Kaninchenplasma; nach 3 Std. koagulierten lediglich 51 (47%) Kulturen Rinderplasma, 78 (72%) Kulturen Menschenplasma und 56 (52%) Kulturen Kaninchenplasma. Im Vergleich dazu koagulierten von 34 Kulturen vom Menschen nach 24 Std. 34 (100%) Menschenplasma und 33 (97%) Kaninchenplasma; Rinderplasma wurde von keiner Kultur koaguliert. In der Frühreaktion wurde ebenfalls kein Rinderplasma koaguliert; Menschenplasma wurde von 25 (73%) Kulturen, Kaninchenplasma von 33 (97%) koaguliert (Tab. 4).

Tabelle 4

Reaktion von 107 S. aureus-Kulturen vom Rind und
34 S. aureus-Kulturen vom Menschen mit Rinder-,
Menschen- und Kaninchenplasma

Plasmareaktionen		Anzahl der Kulturen	
		vom Rind	vom Menschen
Rinderplasma positiv	(3 Std.)	51 (47%)	0
	(24 Std.)	87 (82%)	0
Menschenplasma positiv	(3 Std.)	78 (74%)	25 (73%)
	(24 Std.)	107 (100%)	34 (100%)
Kaninchenplasma positiv	(3 Std.)	56 (52%)	21 (62%)
	(24 Std.)	105 (98%)	33 (97%)

4,14 Test auf Clumping-Faktor (CF)

Der Untersuchung auf Koagulasebildung folgten die beiden beschriebenen Tests auf CF. Im Softagar waren von 107 S. aureus-Kulturen vom Rind 86 CF + und 21 CF -, während von 34 Kulturen vom Menschen 17 CF + und 17 CF - waren.

Der empfindlichere Test mit tannisierten Erythrozyten zeigte allerdings, daß auch die im Softagar negativ reagierenden Kulturen, wenn auch nur schwach, CF + waren.

Tabelle 5

Untersuchung auf Clumping-Faktor mit der Softagar-Methode
und mit tannisierten Erythrozyten

		vom Rind ¹⁾	vom Menschen ²⁾
Softagar	positiv	86 (80%)	17 (50%)
	negativ	21 (20%)	17 (50%)
Tannisierte Erythrozyten	stark positiv	86 (80%)	17 (50%)
	schwach positiv	21 (20%)	17 (50%)
	negativ	0	0

1) Insgesamt 107 Kulturen

2) Insgesamt 34 Kulturen

4,15 Auswahl und Charakterisierung

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Auswahl der S. aureus-Kulturen gemäß der Aufgabenstellung getroffen. Es sollten etwa 10 S. aureus-Kulturen vom Rind und etwa 10 vom Menschen ausgewählt werden, welche möglichst CF - sein sollten.

Es wurden hierfür 9 S. aureus-Kulturen vom Rind (R 1 - R 9), der Kristallviolettgruppe A und 9 S. aureus-Kulturen vom Menschen (M 1 - M 3, M 5 - M 10) der Kristallviolettgruppe C ausgewählt. Alle Kulturen waren stark koagulase-positiv bei relativ geringer CF-Aktivität.

Die Charakterisierung der ausgewählten S. aureus-Kulturen umfaßte die Untersuchung auf Phosphatase, Lipase, Fibrinolysin, Eigelb-Faktor, Gelatinase und Nuklease. Ferner

wurde α -, β - und Δ -Hämolysin bestimmt. Von 9 Kulturen vom Rind bildeten alle Phosphatase, 8 Lipase und 9 Nuklease, während Fibrinolysin und Eigelbfaktor nicht nachweisbar waren. Von 9 Kulturen vom Menschen zeigten 5 Phosphataseaktivität, je 3 bildeten Lipase und Fibrinolysin, 2 besaßen den Eigelbfaktor, 6 produzierten Gelatinase und 9 Nuklease. α -Hämolysin wurde von je 4 Kulturen vom Menschen und vom Rind gebildet. Alle 9 Kulturen vom Rind bildeten β -Hämolysin, während nur 5 Kulturen vom Menschen diese Fähigkeit aufwiesen. Δ -Hämolysin wurde von 7 Kulturen vom Menschen und von 2 Kulturen vom Rind produziert.

Tabelle 6

Nachweis von Enzymaktivitäten bei den 18 ausgesuchten
S. aureus-Kulturen

Herkunft der Kulturen:	vom Rind	vom Menschen
Phosphatase	9	5
Lipase	8	3
Fibrinolysin	0	3
Eigelb-Faktor	0	2
Gelatinase	0	6
Nuklease	9	9
α	4	4
Hämolysin β	9	5
Δ	2	7

4,2 Produktion von Koagulase

4,21 Kulturbedingungen

Es wurden die Wachstumsverhältnisse in der Hauptkultur bestimmt, die zu einer maximalen Koagulasebildung bei möglichst niedriger Produktion der anderen Enzyme und Toxine, besonders der Hämolyse, führten. Dafür wurde in 15 Einzelmessungen über den Zeitraum von 0-48 Std. Zellzahl pro ml Kulturmedium, die optische Dichte bei 600 nm und der pH-Wert der Bouillon untersucht. Es wurden je 1 Kultur vom Menschen (M 6) und vom Rind (R 9) nebeneinander geprüft (Tab. 7, 8). Unmittelbar nach dem Beimpfen der Hauptkulturen befanden sich bei M 6 24×10^6 , bei R 9 26×10^6 Zellen/ml Bouillon. M 6 erreichte nach 30 Std. mit $9,1 \times 10^9$ seine höchste Zelldichte, während R 9 bereits nach 24 Std. mit $8,1 \times 10^9$ Zellen/ml sein Maximum erreichte. Der pH-Wert war bei beiden Kulturen unmittelbar nach der Inokulation bei 7,0. Bei M 6 fiel er bis zur 6. Std. auf 5,1 ab, erreichte um die 11. Std. erneut den Neutralpunkt, um dann auf 8,3 um die 48. Std. anzusteigen. R 9 erreichte mit pH 5,2 um die 5. Std. seinen niedrigsten Wert, passierte um die 10. Std. den Neutralpunkt und besaß nach 48 Std. den pH-Wert 8,2.

Von besonderem Interesse war die Feststellung, von welchem Zeitpunkt der Bebrütung Koagulase und Hämolyse nachweisbar wurde und wie sich deren Aktivitäten im Laufe der Bebrütungszeit änderten.

Bereits nach 2 Std. war in beiden Kulturen Koagulase nachzuweisen. M 6 produzierte nach 3 Std. bereits 16 MCD/ml und erreichte mit 30 Std. ein Maximum von 64 MCD/ml. Von diesem Zeitpunkt ab fiel die Aktivität wieder. Bei Kultur R 9 waren nach 2 Std. 8 MCD/ml nachweisbar. Bis zur 10. Std. steigerte sich die Aktivität auf 32 MCD/ml. Mit 18 Std. erfolgte bereits ein Rückgang.

Bei der Untersuchung auf Hämolysin wurde festgestellt, daß eine Aktivität dieses Toxins bei beiden Kulturen erst nach 6 Std. bei 37°C nachweisbar war.

Tabelle 7

Wachstum-, Koagulase- und Hämolysinbildung, pH-Werte und optische Dichte von S. aureus, M 6, in Brucella Broth bei 37°C

Stunden bei 37°C	Zellzahl pro ml x 10 ⁶	Optische Dichte	Koagulase (MCD) ¹⁾ K-Pl ³⁾	Hämolysin (MHD) ²⁾			pH- Wert
				α	β	Δ	
0	24	0,009	0	-	-	-	7,0
0,5	36	0,010	0	-	-	-	7,0
1	50	0,018	0	-	-	-	6,9
2	111	0,04	2	-	-	-	6,9
3	472	0,11	16	-	-	-	6,7
4	734	0,20	16	-	-	-	6,3
5	860	0,27	16	-	-	-	6,0
6	1640	0,32	16	1	-	-	5,1
8	2180	0,37	32	4	1	-	6,5
10	3240	0,41	16	8	2	2	6,9
12	4840	0,51	16	32	4	4	7,2
18	6140	0,59	16	16	16	16	7,7
24	7320	0,66	32	32	8	8	7,9
30	9180	0,70	64	32	8	16	8,1
36	8080	0,72	16	64	16	16	8,2
48	5780	0,72	0	32	8	8	8,3

1) MCD = Minimale Clotting Dosis

2) MHD = Minimale hämolytische Dosis

3) K-Pl = Kaninchenplasma

Tabelle 8

Wachstum-, Koagulase- und Hämolyysinbildung, pH-Werte
und optische Dichte von S. aureus, R 9,
in Brucella Broth bei 37°C

Stunden bei 37°C	Zellzahl in Mill.	Optische Dichte	Koagulase (MCD)		Hämolyysin (MHD)			pH- Wert
			R-Pl	K-Pl	α	β	Δ	
0	26	0,015	0	0	-	-	-	7,0
0,5	33	0,018	0	0	-	-	-	7,0
1	36	0,02	0	0	-	-	-	6,9
2	89	0,05	8	8	-	-	-	6,8
3	300	0,10	8	8	-	-	-	6,4
4	604	0,19	8	8	-	-	-	5,9
5	720	0,26	8	16	-	-	-	5,2
6	1440	0,35	8	32	1	-	-	6,2
8	2100	0,63	16	16	2	4	-	6,8
10	2600	0,48	32	64	2	4	-	7,0
12	3780	0,52	32	32	2	4	-	7,2
18	5320	0,62	16	16	2	4	-	7,5
24	8160	0,70	16	16	2	4	-	7,8
30	7080	0,78	8	16	2	2	-	8,0
36	7820	0,84	8	8	1	2	-	8,1
48	6820	0,85	8	8	0	0	-	8,2

MCD = Minimale Clotting Dosis

MHD = Minimale hämolytische Dosis

R-Pl = Rinderplasma

K-Pl = Kaninchenplasma

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde für die Produktion von Koagulase unter den Versuchsbedingungen eine Bebrütungszeit von 4 Std. gewählt. Zu diesem Zeitpunkt wurde bereits eine genügend hohe Aktivität an Koagulase bei gleichzeitig niedrigem Hämolysinanteil beobachtet.

4,22 Anreicherung von Koagulase

Die Anreicherung von Koagulase wurde in 2 Schritten vollzogen. Durch den ersten Schritt, die Säurepräzipitation bei pH 3,6, konnte eine etwa 7fache Anreicherung von Koagulase erzielt werden. Durch den 2. Anreicherungsschritt, die Fällung mit halbgesättigtem Ammoniumsulfat, wurde die Aktivität etwa auf das 21fache gesteigert. Die größte Anreicherung, etwa 185fach, wurde bei der Koagulase von M 6 durch dieses Anreicherungsverfahren erzielt (Tab. 9). Die Koagulaseanreicherung von M 6 koagulierte in einer Konzentration von 5200 MCD/ml als einzige auch Rinderplasma.

Tabelle 9

Spezifische Aktivitätssteigerung in MCD¹⁾/mg Protein
von Koagulase während des Anreicherungsverfahrens

Kul- turen	Über- stand	Nach Fällung bei pH 3,6	(NH ₄) ₂ SO ₄ 50% sat.	AF ²⁾
R 1	32,2	67,8	80,0	2,5
R 2	8,8	50,2	89,0	10,1
R 3	23,3	247,5	359,5	15,4
R 4	22,5	58,7	116,3	5,2
R 5	1,1	3,7	6,8	6,2
R 6	32,1	36,6	244,0	7,6
R 7	7,0	63,7	89,4	12,8
R 8	39,8	133,2	222,5	5,6
R 9	15,2	333,3	496,0	30,9
M 1	54,1	263,9	315,7	5,8
M 2	4,5	64,6	131,1	29,1
M 3	68,3	124,3	183,9	2,7
M 5	3,1	45,1	88,9	28,7
M 6	16,6	121,9	3084,3	185,8
M 7	5,3	37,2	66,7	12,6
M 8	51,6	148,8	278,3	5,4
M 9	50,0	213,3	347,8	6,9
M10	40,5	211,6	307,7	7,6
Durchschnittlicher Anreicherungsfaktor				21,1

1) MCD = Minimale Clotting Dosis

2) AF = Anreicherungsfaktor

4,23 Hämolysine

Hämolysine ließen sich durch die zur Anreicherung von Koagulase gewählte Versuchsanordnung nicht immer ausschalten. α -Hämolysin wurde etwa 4fach, β -Hämolysin etwa 1,4fach und Δ -Hämolysin etwa 4fach durch das beschriebene Verfahren angereichert. Der Anreicherungs-faktor für die Hämolysinbildung war nach der Präzipitation bei pH 3,6 wesentlich höher als nach Präzipitation mit 50% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

4,3 Charakterisierung der Koagulasen

4,31 Kreuzneutralisationstest

Beim Kreuzneutralisationsversuch der 4 Antiseren AM3, AM6, AR3, AR9 mit 18 standardisierten Koagulasen traten Neutralisationstiter von 1 : 4 bis 1 : 32 auf (Tab. 10). AM6 neutralisierte alle 18 Koagulasen, AM3 neutralisierte 14 Koagulasen, AR3 neutralisierte 8 und AR9 neutralisierte 7 Koagulasen.

Tabelle 10

Kreuzneutralisation von 18 Antigenen durch 4 Antiseren
Die Titer sind als reziproke Zahlenwerte angegeben

Koagulasen	Antiseren gegen Koagulasen von			
	M3	M6	R3	R9
M 1	8	4	-	-
M 2	16	16	8	8
M 3	8	32	-	-
M 5	-	32	-	-
M 6	8	32	8	-
M 7	8	32	-	-
M 8	-	32	-	-
M 9	-	32	-	-
M10	16	32	32	32
R 1	8	8	-	8
R 2	16	16	16	8
R 3	32	32	32	16
R 4	-	8	-	-
R 5	32	32	8	32
R 6	8	16	16	8
R 7	8	8	16	-
R 8	8	8	-	-
R 9	8	8	8	16

Die 18 Koagulasen besaßen serologische Unterschiede und ließen sich in 4 Gruppen einordnen (Tab. 11).

Tabelle 11

Einordnung der 18 Koagulasen in 4 serologische Gruppen

Serologische Gruppen	Antiseren gegen			
	M3	M6	R3	R9
I (M1, M7, R1, R8)	+	+	-	-
II (M5, M8, M9, R4)	-	+	-	-
III (M3, M6, R7)	+	+	+	-
IV (M2, M10, R2, R3, R5, R6, R9)	+	+	+	+

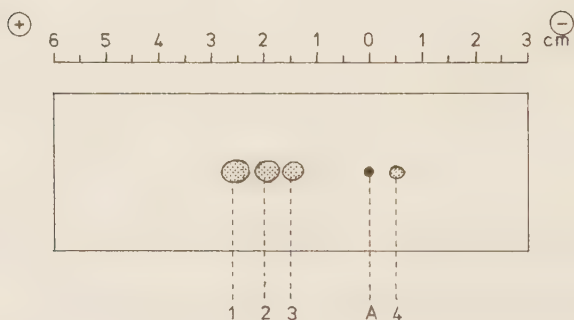
4,32 Elektrophorese

Die Koagulasepräparationen der 18 untersuchten Kulturen zeigten deutliche elektrophoretische Unterschiede. Sie wanderten sowohl zur Kathode als auch zur Anode, und zwar 14 Präparate sowohl zur Anode als auch zur Kathode (Abb.1) und 4 Präparate nur zur Anode (Abb.5). Bei ihrer Wanderung zur Anode legten 15 Präparate 29 mm zurück (Abb.2), 3 Präparate legten 36 mm zurück (Abb.3). Bei der Wanderung zur Kathode wurde eine Strecke von 10 mm zurückgelegt (Abb.2). Die Koagulasen der Kulturen M1, M3, M4, M6, M7, M8, M9 und R6 gaben keine deutlichen Banden (Abb. 3, 6), während es bei den übrigen 10 Präparationen zu mehr oder weniger deutlichen Banden kam. Bei diesen Präparationen konnten 4 Banden einzeln oder in Kombination beobachtet werden (Abb.9). In einem Übersichtsdiagramm sind die auftretenden Banden zusammengefaßt (Diagramm 1).

Diagramm 1

Übersichtsdiagramm der elektrophoretischen Ergebnisse

- 1 Bande bei +26 mm
- 2 Bande bei +20 mm
- 3 Bande bei +15 mm
- 4 Bande bei - 5 mm
- A Auftragsstelle



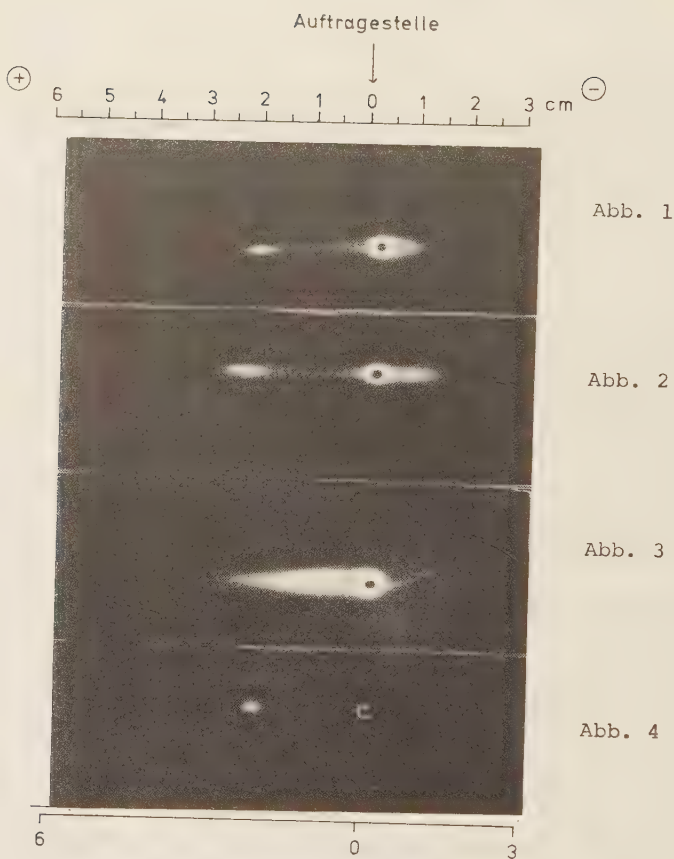
Es traten so entweder 1 Bande bei 20 mm (Abb.4), eine bei 26 mm (Abb.2), oder je 2 Banden bei 15 und 20 mm (Abb.7) beziehungsweise bei 20 und 26 mm (Abb.8) oder gleichzeitig 3 Banden bei 15, 20 und 26 mm (Abb.9) auf. Es war bemerkenswert, daß bei der Mehrzahl der Koagulaseanreicherungen der S. aureus-Kulturen vom Menschen eine Wanderung ohne deutliche Banden auftrat, während Koagulaseanreicherungen von S. aureus vom Rind häufiger Banden aufwiesen. Trotz dieser anscheinend charakteristischen Elektrophorogramme war eine Einteilung in bestimmte Gruppen nicht möglich.

Die elektrophoretische Auftrennung und die anschließende Identifizierung durch Einwirkung eines Fibrinogen-Aktivator (CRF)-Gemisches war jedoch nützlich bei der Identifizierung der immunoelektrophoretischen Präzipitationslinien.

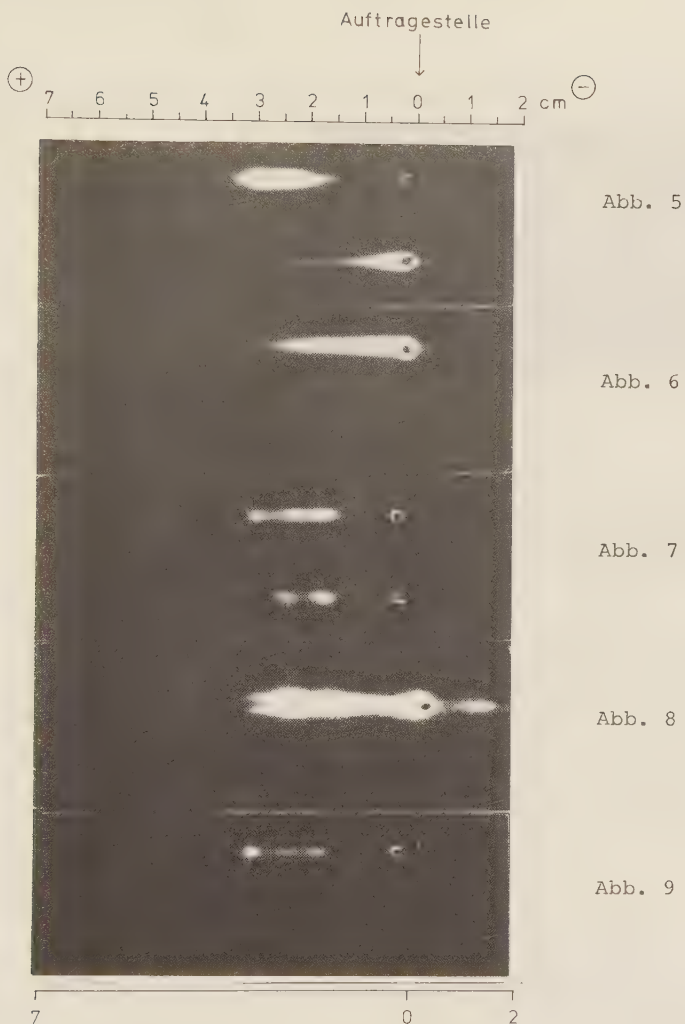
4,33 Immunelektrophorese

In der Immunelektrophorese wurde das Verhalten von 18 Koagulaseanreicherungen gegenüber 4 verschiedenen Antiseren getestet. Bei den meisten Koagulasepräparationen traten deutliche Präzipitationslinien auf. Sie erstreckten sich über einen Bereich von 0 bis + 36 mm (Abb.10) oder von 0 bis +28 mm (Abb.11).

Die immunoelektrophoretischen Präzipitationslinien wurden mit den im Elektrophorogramm identifizierten Koagulasebanden verglichen. Auf diese Weise konnten einige Koagulase-Antikoagulase-Präzipitationslinien identifiziert werden. Diese Linien erlaubten aber keine definitive Einordnung der untersuchten Kulturen. Somit war es auch nicht möglich, Beziehungen zwischen den Ergebnissen des Neutralisationstestes und der elektrophoretischen und immunologischen Untersuchungen abzuleiten.



Elektrophorogramme (250 V., 6 m Amp., 2 Std., 4°C) der Koagulasen von Staphylokokken-Kulturen M2 (Abb.1), R2 (Abb.2), M6 (Abb.3) und R9 (Abb.4)



Elektrophorogramme (250 V., 6 m Amp., 2 Std., 4°C) der Koagulasen von Staphylokokken-Kulturen R7 (oben) und M9 (unten) (Abb.5), M8 (Abb.6), R3 (Abb.7), R8 (Abb.8) und R4 (Abb.9)

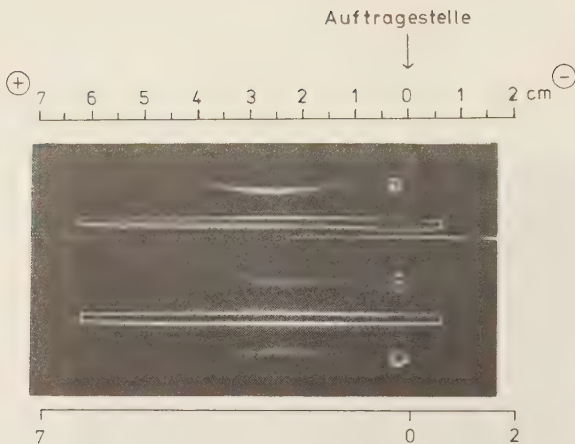


Abb. 10

Abb. 11

Repräsentative Immunelektrophorogramme (250 V.,
6 m Amp. 2 Std., 4°C; Immundiffusion 24 Std.)

Abb. 10 Koagulase M1 und Antikoagulase M6

Abb. 11 Koagulase M7 (oben) und Koagulase M8
(unten) mit Antikoagulase R3

5,0 DISKUSSION

Bei der Identifizierung der Staphylokokken-Kulturen zeigte sich, daß nicht alle die Charakteristika von S. aureus besaßen. Es wurden deshalb nur koagulase-positive und mannit-positive Kulturen für diese Untersuchungen verwendet.

Die Kristallviolett-Reaktion bestätigte weitgehend die Befunde von MEYER (30). Alle vom Menschen isolierten S. aureus-Kulturen ließen sich dem Typ C (Mensch) und die überwiegende Anzahl der Kulturen vom Rind dem Typ A (Rind) zuordnen. Da aber die vom Rind stammenden Kulturen aus Kuhmilch isoliert worden waren, wäre die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß die Keime durch Verunreinigungen in die Milch gelangt waren.

Bei der Auswahl der zur Koagulaseanreicherung verwendeten Kulturen war neben der Koagulase-Produktion zu berücksichtigen, daß sie S. aureus angehörten und daß ihre Herkunft mit der typischen Kristallviolettgruppe übereinstimmte. Von allen untersuchten Kulturen zeigten nur 9 vom Menschen und 9 vom Rind die gewünschten Eigenschaften.

Die Ergebnisse des Koagulasetestes, wonach nur S. aureus-Kulturen vom Rind Rinderplasma koagulierten, während Koagulation von Rinderplasma durch Kulturen vom Menschen nicht vorkam, stimmten mit den Ergebnissen von MEYER (29) überein. Alle Kulturen, welche Rinderplasma koagulierten, ließen sich, in Übereinstimmung mit ihrer Herkunft, dem Kristallviolett-Typ A (Rind) zuordnen.

Die zur Anreicherung verwendeten Methoden waren nicht in gleichem Maße wirksam. Die Fällung bei pH 3,6 führte zwar zur gewünschten Trennung der Proteine vom Kulturüberstand, aber sie zeigte auch die Auswirkungen einer weniger schonenden Präzipitation der Proteine. Diese wurde bereits während des Anreicherungsverfahrens offensichtlich, als größere Mengen an denaturiertem Protein auftraten.

Das Auftreten von 4 serologischen Gruppen im Kreuzneutralisationstest bestätigt die von DUTHIE und LORENZ (9) gefundenen Ergebnisse. Auch diese Autoren fanden 4 Gruppen und vermuteten weitere. Zur Erzeugung von Antikörpern wäre die Verwendung von hochgereinigten Koagulasen wünschenswert.

Die Frage, ob sich S. aureus vom Menschen und S. aureus vom Rind durch ihre Koagulasen unterscheiden ließen, konnte nicht positiv beantwortet werden. Es koagulierte zwar S. aureus-Kulturen vom Menschen in keinem Falle Rinderplasma, und im Elektrophorogramm zeigte die Mehrzahl der Kulturen vom Menschen ein anderes Verhalten als Kulturen vom Rind. Aber dennoch konnte kein "typisches" Verhalten der einen oder der anderen Koagulasen nach der Herkunft ihrer Kulturen abgeleitet werden. Es wäre bestenfalls möglich gewesen, einen Teil der Kulturen vom Rind zu identifizieren, denn nicht alle Kulturen vom Rind koagulierte auch Rinderplasma. Der übrige Teil der Kulturen vom Rind unterschied sich nicht durch sein Plasmaverhalten von Kulturen vom Menschen. Es fehlte also den Kulturen vom Rind ein einheitliches Plasmaverhalten, wie es hier die Kulturen vom Menschen zeigten, sodaß nur die Rinderplasma-positiven Kulturen als vom Rind stammend identifiziert werden könnten. Die Ergebnisse des Kreuzneutralisationstestes

sprachen gegen eine Möglichkeit der Einteilung der Koagulasen entsprechend der Herkunft ihrer Kulturen. In jeder der 4 serologischen Gruppen traten sowohl Kulturen vom Menschen als auch vom Rind auf. Es waren somit keine Anhaltspunkte für Unterscheidungsmöglichkeiten der Koagulasen von Staphylokokken vom Rind und vom Menschen vorhanden.

6,0 ZUSAMMENFASSUNG

Von 107 S. aureus-Kulturen vom Rind gehörten 99 (92,5%) dem Kristallviolett-Typ A (Rind) und 8 (7,5%) dem Typ C (Mensch), von 34 S. aureus-Kulturen vom Menschen 34 (100%) dem Typ C (Mensch) an.

Von den 107 S. aureus-Kulturen vom Rind koagulierten 87 (81%) Rinderplasma, 107 (100%) Menschenplasma und 105 (98%) Kaninchenplasma, während von 34 S. aureus-Kulturen vom Menschen keine (0%) Rinderplasma, 34 (100%) Menschenplasma und 33 (97%) Kaninchenplasma koagulierte. Aufgrund ihrer Koagulasebildung wurden zur Produktion und Anreicherung 9 S. aureus-Kulturen vom Rind und 9 vom Menschen ausgewählt. Mit ihnen konnten optimale Kulturbedingungen in Brucella Broth nach 4 Std. bei 37°C erzielt werden.

Koagulase wurde durch Präzipitation bei pH 3,6 aus dem Überstand gefällt und mittels Fraktionierung in 50% ges. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ angereichert. Der durchschnittliche Gesamtanreicherungsfaktor war 22.

Im Kreuzneutralisationstest ließen sich 18 Koagulasenanreicherungen in 4 serologische Gruppen einteilen.

Im Elektrophorogramm traten bei den 18 Koagulasen Unterschiede auf. Eine Einteilung aufgrund der Wanderungseigenschaften war jedoch nicht möglich.

In der Immunelektrophorese traten unterschiedliche Präzipitationslinien auf. Einige von ihnen wurden als Koagulase-Antikoagulase-Linien identifiziert. Eine Beziehung zwischen den Ergebnissen der Kreuzneutralisation und der Immunelektrophorese konnte nicht abgeleitet werden.

7,0 LITERATURVERZEICHNIS

1. ALAMI, S.Y.
KELLY, F.C.
Demonstration of staphylococcal clumping factor and free coagulase in soft agar media.
J. Bact. 78, 539-544 (1959)
2. BARBER, M.
WILDY, P.
A study of the antigenic specificity of staphylococcal coagulase in relation to bacteriophage group.
J. gen. Microbiol. 18, 92-106 (1958)
3. BLOBEL, H.
BERMAN, D.T.
SIMON, J.
Purification of staphylococcal coagulase.
J. Bact. 79, 807-815 (1960)
4. BOAKE, W.C.
Antistaphylocoagulase in experimental staphylococcal infection.
J. Immunol. 76, 89-96 (1956)
5. BREED, R.S.
MURRAY, E.G.S.
SMITH, N.R.
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
7. Aufl.
The Williams & Wilkins Comp.,
Baltimore, USA (1957)
6. DAVIES, G.E.
Factors influencing the in vitro production of staphylococcal coagulase.
J. gen. Microbiol. 5, 687-697 (1951)

7. DURRANI, N. Biochemische Differenzierung von
 Staphylococcus aureus verschiede-
 ner Herkunft.
 Diss. Gießen (1968)

8. DUTHIE, E.S. Variation in antigenic composition
 of staphylococcal coagulase.
 J. gen. Microbiol. 7, 320-326
 (1952)

9. DUTHIE, E.S. Staphylococcal coagulase: Mode of
 LORENZ, L. action and antigenicity.
 J. gen. Microbiol. 6, 95-101
 (1952)

10. DUTHIE, E.S. The production of free staphylo-
 coccal coagulase.
 J. gen. Microbiol. 10, 437-444
 (1954)

11. DUTHIE, E.S. The action of fibrinogen on
 certain pathogenic cocci.
 J. gen. Microbiol. 13, 385-393
 (1955)

12. DUTHIE, E.S. Purification of free staphylo-
 HAUGHTON, G. coccal coagulase.
 Biochem. J. 70, 125-134 (1958)

13. EDWARDS, S.J. The characters and distribution
 RIPPON, J.E. of certain staphylococci patho-
 genic for the bovine udder.
 J. comp. Path. 67, 111-125
 (1957)

14. ELEK, S.D. Distribution of haemolysin in
 pathogenic staphylococci.
 J. Path. Bact. 62, 541-554
 (1950)
15. GLADSTONE, G.P. Staphylococcal haemolysins.
 Post. Mikrobiol. t. v. 2,
 145-161 (1966)
16. HALE, J.H. The influence of coagulase on
 SMITH, W. the phagocytosis of staphylo-
 cocci.
 Brit. J. exp. Path. 26, 209
 (1945)
17. HENDERSON, A. Investigations on staphylococcal
 BRODIE, J. coagulase.
 Brit. J. exp. Path. 44, 524-528
 (1963)
18. ILLES, J. Der Koagulase-Aktivatorgehalt des
 Meerschweinchenplasmas und die
 Hitzeresistenz des Aktivators.
 Path. Microbiol. 28, 834-838
 (1965)
19. JELJASZEWICZ, J. Mechanism of action of staphylo-
 coagulase.
 Congr. Hung. Soc. Microbiol./
 Semmelweis Ann. Week, Budapest
 (1968)
20. KEITH, J. Studies on bovine staphylo-
 LOKEN, D.V.M. coccic mastitis. I. Characteri-
 HOYT, H.H. sation of staphylococci.
 Am. J. Vet. Res. 23, 534-540
 (1961)

21. LACK, C.H. A study of 435 strains of
 WAILLING, D.G. Staphylococcus pyogenes with
 reference to factors which may
 contribute to pathogenicity.
 J. Path. Bact. 68, 431-443
 (1954)
22. LIEB, L. Über die Fermentnatur der
 Staphylokinase.
 Arch. Hyg. Bakteriol. 144,
 31-36 (1960)
23. LIPINSKI, B. Staphylococcal clumping with
 HAWIGER, J. soluble fibrin monomer complexes.
 JELJASZEWICZ, J. J. exp. Med. 126, 979 (1967)
24. LOEB, L. The influence of certain bacteria
 on the coagulation of the blood.
 J. med. Res. 10, (1903-4)
25. LOMINSKI, I. A substance in human serum inhi-
 ROBERTS, G.B.S. biting staphylocoagulase.
 J. Path. Bact. 58, 187-197 (1946)
26. LOMINSKI, I. Susceptibility and resistance to
 staphylococcal infection.
 J. gen. Microbiol. 3, 9 (1949)
27. LOWRY, O.H. Protein mesurement with the folin
 ROSENBOUGH, N.J. phenol reagent.
 FARR, A.L. J. Biol. Chem. 193, 265-275
 RANDALL, R.J. (1951)
28. MARSTON, J. Coagulase production by Staphylo-
 FAHLBERG, W.J. coccus aureus. II. Growth and
 coagulase production in complex
 and chemically definied mediums.
 J. Infect. Diseases. 106, 116-122
 (1960)

29. MEYER, W. Über die Brauchbarkeit des
Koagulasetestes mit verschie-
denen Plasmaarten zur Dif-
ferenzierung von Staphylococcus
aureus-Stämmen.
Zbl. Bakt. 201, 331-338 (1966)
30. MEYER, W. Über die Brauchbarkeit des
Kristallviolett-Testes zur
Differenzierung von Staphylo-
coccus aureus-Stämmen.
Zbl. Bakt. 153, 158-169 (1967)
31. MIALE, J.B. Staphylococcal isocoagulases.
WINNINGHAM, A.R. Nature 197, 392 (1963)
KENT, J.W.
32. MUNCH, H. Über eine Vorstufe des Fibrin-
fermentes in Kulturen von
Staphylococcus aureus.
Biochem. Zeitschr. 14, 143 (1908)
33. MURRAY, M. Purification of staphylococcal
GOHDES, P. coagulase.
Biochim. Biophys. Acta 40,
518-522 (1960)
34. NAKAGAWA, M. Studies on staphylococci
from the bovine udder.
I. Biological characteristics
of staphylococci.
Jap. J. Vet. Res. 6, 19-34 (1958)

35. RAMMELKAMP, C.H. Specific coagulase of Staphylo-
HEZEBECKS, M.M. coccus aureus.
DINGLE, J.H. J. exp. Med. 91, 295 (1950)
36. RAMMELKAMP, C.H. Antigenicity of cell-free
BADGER, G.F. staphylococcal coagulase.
DINGLE, J.H. J. Infect. Dis. 86, 159 (1950)
FELLER, A.E.
HODGES, R.G.
37. ROGERS, D.E. Survival of staphylococci with
TOMPSETT, R. human leucocytes.
Bull. N. Y. Acad. Med. 28, 470
(1952)
38. ROGERS, H.J. The rate of formation of hyalu-
ronidase, coagulase and total
extracellular protein by strains
of Staphylococcus aureus.
J. gen. Microbiol. 10, 209-220
(1954)
39. SIWECKA, M. Purification of staphylocoagulase
JELJASZEWICZ, J. and some of its properties.
Zbl. Bakt. 208, 385-394 (1968)
40. SMITH, H.W. The examination of staphylococci
of animal origin with particular
regard to the termination of
criteria of pathogenicity.
J. comp. Path. 57, 98-115 (1947)
41. SMITH, J.M. Behavior of viroilent and aviroilent
DUBOS, R.J. staphylococci in tissues of
normal mice.
J. exp. Med. 103, 87-108 (1956)

42. SMITH, W. The nature and mode of action
HALE, J.H. of staphylococcus coagulase.
Brit. J. exp. Path. 25, 101-
110 (1944)
43. SMITH, W. The role of coagulase in staphy-
HALE, J.H. lococcal infection.
SMITH, M.M. Brit. J. exp. Path. 28, 57
(1947)
44. SOULIER, J.P. Staphylocoagulase and prothrom-
PROU, O. bin.
Thromb. Diath. Haemorrh. Supp.
20, 255-267 (1966)
45. STAMATIN, N. L'activité hémolytique et
TACU, A. coagulante de staphylocoques
MARCIA, D. isolés à partir des infections
humaines ou animales.
Ann. Inst. Pasteur (Paris)
76, 178-180 (1949)
46. STAMATIN, N. La pathogénité pour le pigeon
POPII, V.B. et le hamster, test de
RADUCEANESCU, H. distinction entre les types
CRISTESCU, P. humaines et ovines de
Staphylococcus pyogenes.
VII. Internat. Congr. Microbiol.
Abstr. 392, 30 (1958)
47. STUTZENBERGER, F.J. Production and purification
SAN CLEMENTE, C.L. of staphylococcal coagulase
in a semidefined medium.
Am. J. Vet. Res. 29, 1109-
1116 (1968)

48. TAGER, M. Studies on the coagulase-reacting-factor: I. The reaction of staphylocoagulase with the components of human plasma.
Yale J. Biol. Med. 20, 369-380
(1948)
49. TAGER, M. Studies on the coagulase-reacting-factor: II. Properties of coagulase-reacting-factor and relation to blood clotting components.
HALES, H.B. J. Immunol. 60, 1 (1948a)
50. TAGER, M. The experimental production of antibodies to staphylocoagulase.
HALES, H.B. J. Immunol. 60, 475 (1948b)
51. TAGER, M. Concentration, partial purification, properties and nature of staphylocoagulase.
Yale J. Biol. Med. 20, 487-501
(1948)
52. TAGER, M. Problems in the coagulation of plasma by staphylocoagulase.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 65, 109-118
(1956)
53. TIRUNARAYAN, M.O. Investigation on the enzymes and toxins of staphylococci.
Acta Path. Microbiol. Scand. 68,
273-280 (1966)

Nach Abschluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. H. Blobel für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Hilfe sehr herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. J. Brückler und Herrn Dr. Schaeg, die mir bei der Durchführung meiner Arbeiten stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für ihre finanzielle Unterstützung ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

- 1943 am 31.8. in Walbeck/Südharz geboren
- 1949 Übersiedlung nach Bad Neuenahr/Rheinland-Pfalz
- 1950 Volksschule Bad Neuenahr
- 1954 1.4. Aufnahmeprüfung und Eintritt in das
Staatl. Neuspr. Gymnasium Ahrweiler
- 1963 23.9. Reifeprüfung an der gleichen Lehranstalt
1.10. Studium der Biologie an der Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn
- 1964 1.4. Studium der Veterinärmedizin an der
Justus Liebig-Universität Gießen
- 1966 1.12. Tierärztliche Vorprüfung
- 1970 12.2. Tierärztliche Prüfung
10.3. Bestallung als Tierarzt
1.9. Beginn einer Dissertation am Institut
für Bakteriologie und Immunologie der Justus
Liebig-Universität
- 1971 1.6. Anstellung als wiss. Hilfskraft mit Ab-
schluß durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

Druck: Offset-Köhler KG, 63 Gießen-Wieseck, Kiesweg 23, Telefon 514 99

